

**PRODUCTION OF AGENT FOR INHIBITING ACTIVITY OF UNEASE**

**Patent number:** JP10245344  
**Publication date:** 1998-09-14  
**Inventor:** HOSONO TAKESHI; NAKAJIMA KAJIRO; KAJIWARA  
MASAHIRO  
**Applicant:** OTA ISAN:KK  
**Classification:**  
- international: A61K35/78; A61K35/78; A61K35/78; A61K35/78  
- european:  
**Application number:** JP19970049141 19970304  
**Priority number(s):**

**Abstract of JP10245344**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the medicine having an action to inhibit the activity of a unease produced by pylori bacteria, capable of being safely administered for a long period and effective for preventing and treating gastritis, etc., by concentrating the water extract of cinnamon, separating the clean concentrated solution, leaving the separated clean solution in a specific temperature region, collecting the produced precipitates and subsequently drying the collected precipitates.

**SOLUTION:** This agent for inhibiting the activity of a urease is obtained by adding 5-20 fold weight of water to ground cinnamon, if necessary, heating the mixture at 40-80 deg.C simultaneously extracting the ground cinnamon until not generating a new extract, concentrating the extract solution, until the volume is reduced to 1/7 to 1/15, separating only a clear solution from the concentrated solution, leaving the separated clean solution at 0-10 deg.C, separating the produced precipitates, and subsequently lyophilized the separated precipitates in order to prevent the degradation of the active ingredients. The content of the urease activity-inhibiting agent in the preparation is usually 0.001-50wt.% as its dry weight.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-245344

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月14日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 35/78

識別記号

A E D

A C J

A C L

A D Z

F I

A 6 1 K 35/78

A E D C

A C J

A C L

A D Z

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平9-49141

(22) 出願日 平成9年(1997) 3月4日

(71) 出願人 000148782

株式会社太田胃散

東京都文京区千石2丁目3番2号

(72) 発明者 細野 剛

千葉県習志野市秋津3-2-22-2

(72) 発明者 中島 嘉次郎

茨城県北相馬郡守谷町松前台2-4-11

(72) 発明者 梶原 正宏

埼玉県新座市馬場2-12-9

(74) 代理人 弁理士 阿形 明 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ウレアーゼ活性阻害剤の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ピロリ菌が産生するウレアーゼの活性に対し、大きい阻害作用を有し、しかも長期にわたって安全に投与しうる薬剤を提供する。

【解決手段】 ケイヒの水抽出液を濃縮後、清澄液を分離し、これを0℃～10℃の温度に維持し、生成する沈殿を捕集し、乾燥する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 ケイヒの水抽出液を濃縮後、清澄液を分離し、これを0℃～10℃の温度に維持し、この間に生成する沈殿を捕集し、乾燥することを特徴とするウレアーゼ活性阻害剤の製造方法。

【請求項2】 水抽出液を容量が少なくとも1/5になるまで濃縮する請求項1記載の製造方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、ウレアーゼ特にヘリコバクター・ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) によって産生されるウレアーゼの活性を効率よく阻害するウレアーゼ活性阻害剤の製造方法に関するものである。

**【0002】**

【従来の技術】1983年に胃炎又は胃潰瘍患者の胃粘膜生検組織から、カンピロバクター・ピロリ (*Campylobacter pylori*) が高率に検出されることが報告[「ランセット (Lancet)」第1273～1275ページ (1983年)] されて以来、胃炎あるいは胃・十二指腸潰瘍の発症に、この菌が関与していることが次第に明らかにされてきた。この菌は、その後、カンピロバクター属の他の菌とは別属に属することが証明され、ヘリコバクター・ピロリ (以下、単に「ピロリ菌」ということがある) と改名され、胃炎あるいは胃・十二指腸潰瘍疾患との関連性が深いことが、臨床的にも明らかになってきた。

【0003】このピロリ菌は、胃粘膜、特に胃の出口である幽門部に好んで感染するグラム陰性のらせん状桿菌であり、鞭毛をもつ微好気性菌である。ピロリ菌自体は酸には弱い、他の菌とは異なりウレアーゼを体表面にもつことから、宿主由来の胃内の尿素をアンモニアに分解して胃酸を中和するため、胃の中での生育が可能となる。

【0004】このようなピロリ菌について、NIH (National Institutes of Health) は、1994年2月に「ヘリコバクター・ピロリ陽性の消化性潰瘍症例は、初回あるいは再発にかかわらず除菌すべきである」と勧告声明を出しており、また、WHO (World Health Organization) は、1994年に、ヘリコバクター・ピロリは高率に発がんを誘発するものと認定している。

【0005】ピロリ菌が胃内に定着・増殖し、病原性を発揮する機構としては、ピロリ菌は、他の大腸菌と同じように経口的に胃に到達し、鞭毛を使って粘液層を泳いで胃粘膜層に至り、接着 (癒着) し、ここで自ら産生するウレアーゼによって、宿主由来の尿素を分解し、アンモニアを生成して胃酸を中和し、好ましい生活環境を整備して増殖を開始するが、この際ピロリ菌が合成するアンモニアは、胃の粘膜の表面を覆う粘液を剥がして、粘

膜をむき出しの状態にするため、粘膜は胃酸にさらされて、炎症が起こるためであると一般に考えられている。

【0006】そして、ピロリ菌が、このようにして粘膜に住みつくと、インターロイキン (生理活性物質) を生じ、その結果、リンパ球が増え、好中球 (いずれも白血球の仲間) に作用して活性化をもたらす。好中球の活性化によって次亜塩素酸を生じ、この次亜塩素酸がアンモニアと反応して、細胞に傷害を与える作用が強いモノクロアミンを生成する。このようにして炎症を起すことになるが、この際、ストレスなどによって胃酸の分泌が過剰になると、粘膜はさらに傷付けられ、炎症が潰瘍に進んでいくと考えられている。

【0007】ところで、これまでこのようにして起こる胃炎或は胃・十二指腸潰瘍の予防及び治療に、抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有する抗生物質などを利用しようとする試みが、種々行われてきた。例えば、ペニシリン、アンピシリンなどのβラクタム剤、エリスロマイシン、クラリスロマイシンなどのマクロライド剤、ストレプトマイシン等のアミノグリコシド剤、あるいはテトラサイクリン剤等の抗生物質、及びビスマス製剤のようなピロリ菌に対して強い抗菌作用を示すものを投与することや、また、最近では、H<sub>2</sub>受容体拮抗剤、プロトンポンプ阻害剤などの抗消化性潰瘍剤において、ピロリ菌に対する抗菌活性を併せもつ薬剤の開発も行われている。

【0008】しかしながら、従来の抗生物質などの投与では、長期投与時の安全性が問題とされており、また、再発のおそれがある上、耐性菌が発生するおそれもある。従来の薬剤の中でも臨床的に応用されてきているものもあるが、その評価が一定せず、安全で長期投与が可能である有効な薬剤は、これまで見出されていないのが実情であり、このような状況から、有効で安全な胃炎或は胃・十二指腸潰瘍の予防及び治療に有効で安全な薬剤の出現が望まれていた。他方、ウレアーゼ活性阻害剤としては、例えばヒドロキサム酸及びその変異体やジスルフィド、アスコルビン酸などが知られているが、まだ、実用に供しうるほどの高い活性を示すものは知られていない。

**【0009】**

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような事情のもとで、ピロリ菌が産生するウレアーゼの活性阻害作用を有し、しかも安全で長期投与が可能であって、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍などの予防及び治療剤として有効な薬剤を提供することを目的としてなされたものである。

**【0010】**

【課題を解決するための手段】本発明者らは、安全で長期投与が可能なピロリ菌のウレアーゼ活性阻害剤を開発すべく鋭意研究を重ねた結果、従来よりシナモンとして食品の香辛料などに多用され、また神経性胃炎治療剤として著名な安中散を始めとし、種々の漢方薬の成分とし

て用いられているケイヒの抽出物が、ピロリ菌の産生するウレアーゼの活性阻害作用を有することを見出し、これを新規なウレアーゼ活性阻害剤として提案したが（特願平8-336860号）、さらに研究を重ねた結果、ケイヒから非常に簡単な手段で、しかも高活性のウレアーゼ活性阻害作用を有する物質を製造しうることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

【0011】すなわち、本発明は、ケイヒの水抽出液を濃縮後、清澄液を分離し、これを0℃～10℃の温度に維持し、この間に生成する沈殿を捕集し、乾燥することを特徴とするウレアーゼ活性阻害剤の製造方法を提供するものである。

【0012】本発明方法において、原料として用いるケイヒの水抽出液は、ケイヒの粉碎物に水を加えて抽出した水エキスであるが、この抽出方法としては、特に制限はなく、ケイヒ中の水溶性成分をほとんど完全に水中に移行させる方法であればどのような方法を用いてもよい。

【0013】通常は、ケイヒ粉碎物に、水を加え、必要に応じ40～80℃、好ましくは50～60℃の温度に加温しながら、もはや新たな抽出分が認められなくなるまで抽出する。この際、水の量があまり少ないと抽出が不十分になるし、また水の量があまり多いと、後続の濃縮行程に長時間を要することになるので、通常はケイヒ粉碎物に対し重量に基づき5～20倍、好ましくは8～12倍の範囲で選ばれる。また、抽出温度は、高いほど抽出効率がよくなるが、あまり高いと有効成分が破壊されるおそれがあるので、上記の範囲内で選ぶのが好ましい。このようにして抽出処理が行われたのち、ろ過又は遠心分離により固形分を除き、本発明の原料として用いる。

【0014】このようにして調製された水抽出液は、次にその容量が少なくとも1/5、好ましくは1/7ないし1/15になるまで濃縮される。この際、沈殿や白濁を生じることがあるので、これを適当な手段で処理し、清澄液のみを分離する。この際の固形分の分取は、ろ過、遠心分離、傾しゃなどを用いて行われる。

【0015】次に、この清澄液を0℃～10℃に維持し、静置すると次第に沈殿が形成されてくる。この際必要ならば、積極的に冷却し、沈殿生成を促進してもよい。このようにして、もはや沈殿の新しい生成が認められなくなったならば、この沈殿を捕集する。この静置時間は通常24～72時間の範囲である。沈殿の捕集は、ろ過、遠心分離のいずれでもよい。このときに分けられたる液部分には、まだウレアーゼ活性を阻害する物質が含まれているので、さらにウレアーゼ活性阻害剤の原料として用いられる。

【0016】上記のようにして得た沈殿を乾燥すれば、非常に高いウレアーゼ活性阻害作用を示す物質が得られる。この乾燥は、自然乾燥、温風乾燥でもよいが、活性

成分が破壊されるのを防ぐために凍結乾燥によるのが好ましい。

【0017】このようにして得られる本発明のウレアーゼ活性阻害剤は、公知のウレアーゼ活性阻害剤であるアスコルビン酸の約5倍の活性を有する。この本発明のウレアーゼ活性阻害剤はそのまま、あるいは、希釈又は濃縮若しくは凍結乾燥したのち、粉末状又はペースト状に調製し、所望により適宜製剤化して、胃炎、胃潰瘍又は十二指腸潰瘍の予防剤及び治療剤として用いることができる。

【0018】また、製剤中のウレアーゼ活性阻害剤の含有量は、乾燥重量として、通常0.0001～50重量%、好ましくは0.001～30重量%の範囲である。製剤の剤形については特に制限はなく、例えば錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、液剤など、いずれであってもよい。さらに、この剤形に応じて、賦形剤などの添加剤を適宜用いることができる。また、本発明のウレアーゼ活性阻害剤には、所望により、制酸剤や胃粘膜修復剤などの他の有効成分を配合してもよい。

【0019】さらに、本発明のウレアーゼ活性阻害剤は、例えば常法に従って液体や固形の食品の形に調製することができ、一般によく知られている他の食品素材、香料なども適宜併用することができる。このような他の食品素材としては、従来食品分野において慣用されているもの、例えば小麦粉、デンプン、タンパク質やその分解物、糖質、脂質、ビタミン類、ミネラルなどが挙げられる。

【0020】

【発明の効果】本発明のウレアーゼ活性阻害剤は、ピロリ菌が産生するウレアーゼの活性に対し、強い阻害作用を有し、しかも安全で長期投与が可能であって、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍などの予防及び治療剤として有効である。また、本発明のウレアーゼ活性阻害剤は、医薬品の形態及び食品の形態のいずれの形態としても提供することができる。

【0021】

【実施例】次に、本発明を実施例及び試験例によりさらに詳細に説明するが、本発明は、これらの例によってなんら限定されるものではない。

【0022】実施例

広南ケイヒ粉末5.0kgを水50リットル中に投入し、60℃において3.5時間抽出処理を行ったのち、遠心分離機にかけて、固形物と抽出液とに分けた。次いで、この抽出液を全量が約4.2リットルになるまで濃縮したのち、傾しゃにより清澄液を分離する。この清澄液を約4℃において24時間静置すると、微細な沈殿が生成するので、これを遠心分離して捕集し、次いで凍結乾燥することにより、かつ色粉末状のウレアーゼ活性阻害剤10.71gを得た。

【0023】試験例

実施例で得たウレアーゼ活性阻害剤のウレアーゼ活性阻害測定試験を、ピロリ菌由来のウレアーゼと構造的に類似し、一般的にピロリ菌由来のウレアーゼの活性阻害測定に使用されているナタ豆（ジャックビーン）由来のウレアーゼを用い、以下の方法によって行った。 $^{13}\text{C}$ -標識尿素（99原子% $^{13}\text{C}$ 、トレーサーテクノロジー社製）1mgを、外径5mmのNMRチューブ内に入れ、1/15モル/リットル濃度のリン酸ナトリウム緩衝液（pH7）580 $\mu\text{l}$ を加えて $^{13}\text{C}$ -尿素を溶解し、 $^{13}\text{C}$ -NMR測定を行って $^{13}\text{C}$ -尿素のシグナルを確認したのち、NMRチューブを10分間氷冷した。 $^{13}\text{C}$ -NMRのリファレンスとしてTSP（3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-d4）を用い、TSPのシグナルを0ppmとした。

【0024】一方、ウレアーゼ〔ナタ豆由来、和光純薬（株）製〕30mgを1/15モル/リットル濃度のリン酸ナトリウム緩衝液（pH7）20ml中に含有するウレアーゼ溶液を10分間氷冷したのち、このウレアーゼ溶液20 $\mu\text{l}$ を上記のNMRチューブ内に加えて、ただちに $^{13}\text{C}$ -NMR測定を開始し、1分後から13分後まで1分毎に積算回数19回（測定時間1分間）としてNMRスペクトルを測定した。

【0025】これにより、尿素のシグナルは時間の経過とともに減少し、一方、二酸化炭素のシグナルが経時的に増加していく様子が確認できた。なお、測定終了後の反応液のpHは8であった。また、測定後のNMRチュ

ーブの内部から気体を抜き取り、GC-MS測定を行ったところ、 $^{13}\text{C}$ -標識二酸化炭素（m/z:45）の存在が確認できた。

【0026】上記方法により、NMRチューブにウレアーゼ溶液、被検薬物として実施例で得たウレアーゼ活性阻害剤0.25mg及び $^{13}\text{C}$ -標識尿素1mgを加え、 $^{13}\text{C}$ -NMR測定を行い、 $^{13}\text{C}$ -標識尿素の消失時間を、被検薬物を加えていない状態でのそれをコントロールとして比較検討した。この際の $^{13}\text{C}$ -標識尿素の分解を1分後から13分後まで経時的に観測したNMRスペクトルを図1に示す。この図において165.2ppmのシグナルは尿素由来のものであり、162.6ppmのシグナルは $^{13}\text{C}$ -尿素から生成した $^{13}\text{C}$ -二酸化炭素由来のものである。この図から明らかなように $^{13}\text{C}$ -尿素の消失時間は13分であった。次にウレアーゼ活性阻害剤の量を0.5mgに増加し、同様の試験を行ったところ $^{13}\text{C}$ -尿素の消失時間は、20分であった。

【0027】次に、50%阻害濃度（ $\mu\text{g}/600\mu\text{l}$ ）について、公知のウレアーゼ活性阻害物質であるアスコルビン酸に対する相対比を求めたところ、実施例で得たウレアーゼ活性阻害剤の阻害力は、アスコルビン酸の約5倍であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のウレアーゼ活性阻害剤の存在下、ウレアーゼによる $^{13}\text{C}$ -標識尿素の分解の経時変化を示す $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル図。

【図1】

